

文章编号: 1007-4627(2011)03-0343-06

# TILLING 技术的最新进展及其在辐射 诱变育种中的应用前景\*

杜艳<sup>1,2</sup>, 余丽霞<sup>1,2</sup>, 刘青芳<sup>1,2</sup>, 周利斌<sup>1, #</sup>, 李文建<sup>1, #</sup>

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 定向诱导基因组局部突变技术 (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes, 简称 TILLING) 是一种全新的、高通量和低成本反向遗传学研究方法。近年来, 随着突变筛选技术的革新, TILLING 技术平台日趋多元化, 使得 TILLING 技术的操作更为简单、快速, 并广泛应用于作物育种研究领域。简要介绍了 TILLING 技术平台的最新发展动态, 并初步探讨了将辐射诱变处理与 TILLING 高通量筛选相结合在诱变育种中的应用前景。

**关键词:** 定向诱导基因组局部突变技术; 高分辨率溶解曲线; 辐射; 诱变育种

**中图分类号:** Q691.5; Q691.8; Q506 **文献标识码:** A

## 1 引言

随着多种模式生物基因组 DNA 测序的完成, 基因组学进入了以研究基因功能为目标的后基因组时代, 而今功能基因组学已经成为植物科学研究的主流。反向遗传学是功能基因组学的重要组成部分之一, 它利用已有的序列信息, 通过加工、修饰和改造靶基因达到研究基因功能的目的。目前, 植物中常用的反向遗传学方法包括反义 RNA 技术、RNAi 和 DNA 插入突变(如转座子和 T-DNA)。但是, 反义 RNA 抑制技术需要花费相当大的精力来预先确定目标基因是否将会表达; 而 RNAi 的作用机理并不十分清楚, 如后代表型的多样性和不可预知性; 插入突变主要是通过转座子和 T-DNA 插入在基因组中使某些基因发生突变, 但是是一些关键基因的突变对生物是致命的, 而且插入突变技术很难致使每个基因都发生插入突变。同时, 因为这些技术均需耗时的转基因和组织培养, 从而使这些技术在反向遗传学的应用中受到极大限制<sup>[1-2]</sup>。

定向诱导基因组局部突变技术 (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes, 简称 TILLING)

是由美国 Fred Hutchinson 癌症研究中心 Steven Henikof 领导的研究小组发展起来的, 一种全新的、高通量和低成本的反向遗传学研究方法<sup>[3]</sup>。自 2000 年在模式生物拟南芥中应用以来, 已经成功地应用于多种生物中。随着研究的深入, TILLING 技术平台也在多样化。本文总结了近年来 TILLING 技术平台的发展以及最新动态, 为拟开展 TILLING 研究的人员提供综合选择信息。

## 2 TILLING 技术的基本路线

目前最为成熟和应用最为广泛的 TILLING 技术平台是基于酶切以及双色红外荧光检测系统 (CEL I/Li-COR4300) 的技术平台<sup>[4-5]</sup>, 下面以这一技术平台为例来介绍 TILLING 技术的原理和基本路线(见图 1): (1) 适当浓度的化学诱变剂甲基磺酸乙酯 (Ethyl Methanesulfonate, 简称 EMS) 处理种子, 产生一系列的点突变位点; (2) 种植诱变后的种子培养 M<sub>1</sub> 代植株, M<sub>1</sub> 植株自交产生 M<sub>2</sub> 代种子; (3) 培养 M<sub>2</sub> 代植株并提取其总 DNA, 存放于 96 孔板, 形成 DNA 库, 并收取种子形成种子

\* 收稿日期: 2011-01-06; 修改日期: 2011-02-15

\* 基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KJXC2-YW-N34-3, KJXC2-EW-N05); 中国科学院近代物理研究所所长基金资助项目 (Y006090ZY0)

作者简介: 杜艳(1983-), 女(汉族), 四川南充人, 博士, 研究实习员, 从事植物诱变育种研究; E-mail: duyuan@impcas.ac.cn

# 通讯联系人: 李文建, E-mail: wjli@impcas.ac.cn; 周利斌, E-mail: libinzhou@impcas.ac.cn

库；(4) 将若干个 96 孔板 DNA 合并到一个 96 孔板(最多可合并 8 个), 形成 DNA 池；(5) 根据感兴趣的基因序列信息, 设计带有红外荧光标记的特异引物进行多聚酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, 简称 PCR)扩增；(6) PCR 产物经多次变性、复性, 在含有突变位点处形成异源杂合双链；(7) 酶切, 用特异性核酸内切酶酶切异源双链(一般使用 CEL I 酶, 该酶能有效识别并切开杂合双链中的

不配对位点)；(8) 酶切产物电泳分析(通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后用双色红外荧光系统分析电泳结果, 获得突变池)；(9) 利用相同方法从突变池中筛选突变个体；(10) 突变个体 PCR 片段测序(通过全片段测序, 确认核酸多态的类型、位置和数量)；(11) 调出位点变异对应的突变单株的种子, 种植  $M_3$  代, 从表型上验证变异, 最终揭示该基因的生物学功能。

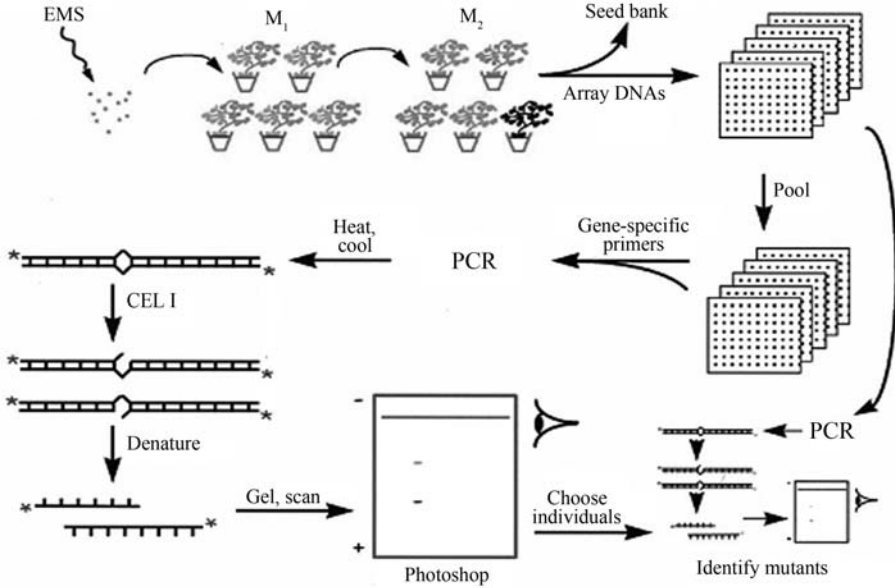


图 1 植物中 TILLING 的技术路线<sup>[4]</sup>

### 3 TILLING 技术平台的发展

最初 TILLING 技术是结合 EMS 诱导突变以及变性高效液相色谱(denaturing high-performance liquid chromatography, 简称 dHPLC)来检测野生型和突变型混合模板的 PCR 扩增产物中异源双链的错配处<sup>[6]</sup>。但该技术的运行时间限制了此方法的高通量运用。Colbert 等<sup>[4]</sup> 2001 发现了一种更经济快速的 TILLING 方法, 它采用双色红外荧光检测 CEL I 酶切产物。CEL I 是一种对错配碱基(异源双链位点)特异性切割的芹菜核酸酶。目前, 该技术平台在国内外应用最为广泛。这一技术平台能够有效排除假阳性条带, 因为杂质和干扰分子在红外光区几乎不发光, 用红外荧光检测不仅背景非常低, 灵敏度也很高, 能够有效排除假阳性条带, 同时也使得 TILLING 技术的高通量得以体现: 筛选每块 96 孔微量滴定板相当于筛选了 768 个  $M_2$  单株( $8 \times$

96), 每个目标筛选区段大约为 1000 bp, 那么每块胶大约可以检测 750 kb 的基因组序列<sup>[7]</sup>。

随着各种筛选技术的不断革新, TILLING 技术平台日趋多元化, 各种技术平台的区别主要体现在异源杂合双链的检测手段方面。虽然, 目前以基于酶切和双色红外检测系统的技术最为成熟和应用最为广泛, 但是由于 CEL I 酶的分选步骤繁多和耗时长, 而商品化的 CEL I 酶价格昂贵, 使得大规模应用的成本难以承受。于是, 近年来越来越多的筛选技术逐渐引入 TILLING 技术平台中, 如焦磷酸测序技术(pyrosequencing)<sup>[8]</sup>、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, 简称 MALDI-TOF-MS)技术<sup>[9]</sup>、构象敏感毛细管电泳技术(Conformation-sensitive capillary electrophoresis, 简称 CSCE)以及高分辨率溶解曲线(high resolution melting, 简称 HRM)技

术<sup>[10-12]</sup>。Gady 等<sup>[10]</sup>于 2009 年在对番茄的研究中将 CSCE 技术应用于 TILLING 检测,并证实了该技术的可行性。2010 年 Chawade 等<sup>[9]</sup>在对燕麦的 TILLING 筛选中引入 MALDI-TOF-MS 技术,并成功鉴定出苯丙氨酸解氨酶基因的 6 个点突变以及  $\beta$ -葡聚糖合成酶基因的 10 个点突变。

常用的几种筛选突变的方法都需要经过 PCR 这一过程。HRM 技术在 PCR 扩增后即可直接用来分析样品,不需要样品的分离纯化,因而可以降低分离纯化过程中所带来的样品污染的可能性,同时也能大大减少工作量。而在众多的新型检测手段中,以 HRM 技术发展潜力最大,在近两年的研究报告中越来越受到研究者的推崇。

### 3.1 HRM 原理及特点

HRM 技术是 2002 年由美国犹他大学和爱德华科技公司合作开发而成,是应用于突变扫描和基因分型的最新遗传学分析方法。其基本原理是:利用饱和和荧光染料 LC Green 标记 DNA 双链,由于突变位点碱基的不匹配会导致双链 DNA 在升温过程中会先解开,荧光染料会从局部解链的 DNA 分子上释放,因而从荧光强度与 DNA 溶解曲线就可以判断突变位点是否存在。

HRM 技术不受突变碱基位点与类型的局限,无需序列特异性探针,在 PCR 结束后直接运行高分辨溶解,即可完成对样品基因型的分析。该技术的优点主要有:(1)快速、高通量;(2)准确性好、灵敏度高、特异性好;(3)重复性接近 100%;(4)费用低;(5)染料探针在 PCR 前加入,不需要后续的分选纯化,而且染料的加入不影响后续的测序工作,实现了真正的闭管操作;(6)只需将 PCR 产物(96/384 孔板)放入仪器内检测即可<sup>[13]</sup>。

英国洛桑农业试验站利用 HRM 技术平台对经 EMS 诱变后的春小麦进行 HRM 突变扫描分析,证明了这种方法在研究小片段的基因靶序列时有很高的灵敏度与成功率,并且在研究那些外显子较小而内含子很大的基因时特别有效<sup>[14]</sup>。与此同时,他们还采用了基于 cDNA 的 HRM 方法对 1100 个大麦样品的 *eIF4E* 基因进行突变筛查,成功地鉴定出了 32 以上个不同的 *eIF4E* 等位基因的突变,大大节省了测序工作的成本和精力<sup>[15]</sup>。Ishikawa 等<sup>[11]</sup>于 2010 应用基于 HRM 的 TILLING 技术平

台,成功筛选到经 N-乙基-N-亚硝基脲(N-Ethyl-N-Nitrosourea, ENU)诱变青鳞后  $P_{53}$  基因发生突变的个体。

### 3.2 HRM 技术平台的改进——iTILLING 技术

尽管 TILLING 技术是一种高通量的筛选手段,但是传统的 TILLING 技术在构建初始的筛选群体以及 DNA 样品的获得时依然需要投入大量的时间和金钱,所以目前只有关于 Columbia 和 Landsberg *erecta* 这两个遗传背景的野生型拟南芥的 TILLING 资源<sup>[16]</sup>。在 HRM 技术平台的基础上,Bush 和 Krysan 于 2010 年对传统 TILLING 技

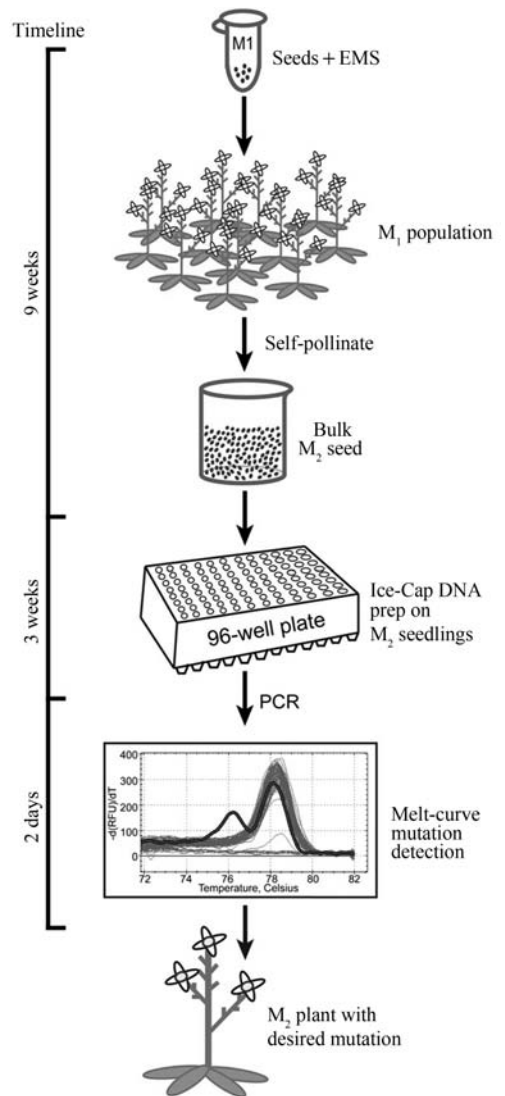


图 2 iTILLING 技术路线<sup>[17]</sup>

术进行了改进,建立起了一个名为 iTILLING(individualized TILLING)的技术以减少突变筛选的成

本(见图 2)。iTILLING 技术与传统的 TILLING 技术相比,其最突出的特点主要体现在以下两个方面:(1)  $M_1$  代种子自交后得到  $M_2$  代种子,  $M_2$  代种子可以整体收获,而不是像传统的 TILLING 技术需要分株收获  $M_2$  代种子。(2) Ice-Cap 系统的应用(见图 3)。  $M_2$  代种子播种在含有琼脂的 96 孔板上,根逐渐生长,部分根组织穿过琼脂进入水相中,下层板经干冰乙醇浴后冻结成冰,移开下层板便可分别得到根组织和幼苗。再结合 HRM 技术进行 TILLING 筛选,筛选到的突变植株可以从上层 96 孔板中移栽至土壤中,进行下一步分析,从而大大缩短了筛选周期<sup>[17-18]</sup>。

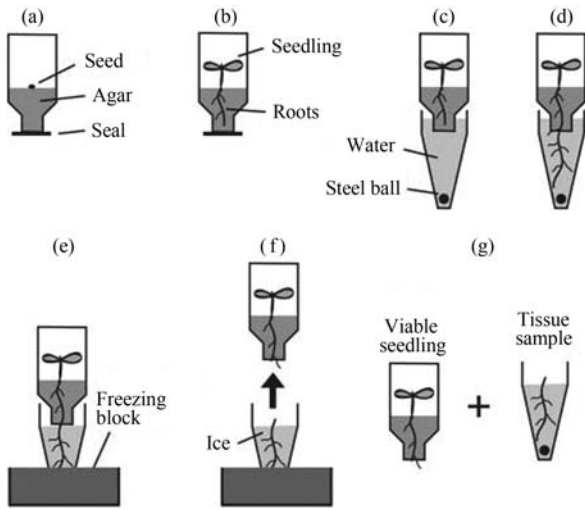


图 3 Ice-Cap 的技术原理<sup>[18]</sup>

## 4 TILLING 技术在辐射诱变育种中的应用展望

### 4.1 技术可行性分析

从理论上讲, TILLING 中的诱变技术可以不采用化学诱变剂,也可以采用物理诱变方式,如射线和粒子辐照等。在对辐射诱变群体采用常规的遗传学手段进行正向筛选的同时也可以结合 TILLING 技术进行反向遗传学筛选。从技术上讲, TILLING 技术与辐射诱变相结合的体系已经得以应用。2005 年, Sato 等<sup>[19]</sup>对经  $\gamma$  射线诱变后的水稻群体进行 TILLING 筛选,并成功筛选出 6 个突变体,在与 EMS 诱变的比较中,发现  $\gamma$  射线引发点突变的平率比 EMS 的低,但是基因敲除突变的频率比 EMS 的高。Morita 等<sup>[20]</sup>人 2009 年在对水稻的诱变研究中也明确推断 TILLING 这一反向遗

传学在研究  $\gamma$  射线诱导高等植物的突变筛选中同样适用。与化学诱变剂 EMS 相比,辐射诱变的特点是诱变点突变的频率相对较低,小片段插入与缺失和大片段插入与缺失的频率较高,而这些变异中可遗传变异主要是由小片段缺失与插入以及少量点突变引起的。研究报道表明, TILLING 技术能够在含有大量个体的群体中有效识别变异单核苷酸多态、小片段插入与缺失和微卫星重复数变化等变异类型<sup>[5]</sup>,因此该技术用于辐射诱变研究,从技术上也是可行的。

### 4.2 TILLING 技术应用于辐射诱变育种的技术路线

参考 EMS-TILLING 流程、 $\gamma$  射线诱变的 TILLING 技术流程以及 TILLING 技术平台的最新发展趋势,提出如图 4 所示技术路线供参考:(1) 辐射诱变获得  $M_1$  种子;(2) 按单株播种  $M_1$  种子,  $M_1$  植株自交获得  $M_2$  种子;(3) 培养  $M_2$  代植株并提取其总 DNA,存放于 96 孔板,形成 DNA 库,并收取种子形成种子库;(4) 将若干个 96 孔板 DNA 合

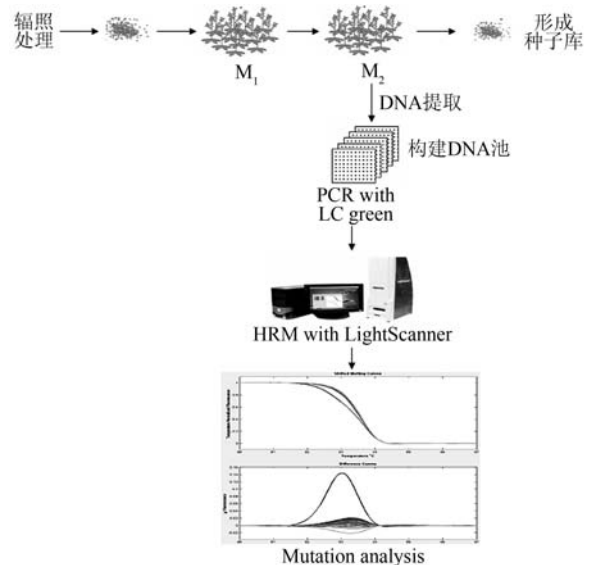


图 4 辐射诱变的 TILLING 筛选流程图

并到一个 96 孔板(最多可合并 8 个),形成 DNA 池;(5) 根据感兴趣的基因序列信息,设计引物,在 PCR 反应前加入 LC Green 饱和荧光染料,然后将 PCR 产物直接放入 LightScanner 中进行溶解,在一定的温度范围内将 PCR 扩增产物进行变性,使 DNA 双链逐渐解链,应用相应软件进行突变分析就可以获得突变池;(6) 利用相同方法从突

变池中筛选突变个体; (7) 突变个体 PCR 片段测序, 通过全片段测序, 确认核酸多态的类型、位置和数量; (8) 调出位点变异对应的突变单株的种子, 种植  $M_3$  代, 从表型上验证变异。

#### 4.3 应用的意义及前景

辐射诱变育种是人为地利用各种物理诱变因素, 诱发植物产生遗传变异, 从而在较短时间内获得有利用价值的突变体, 根据育种目标选育出新品种供生产利用, 或者作为新种质在育种中作为亲本利用。辐射育种以其简便、安全以及突变率高(比自然突变率高 100—1000 倍, 最高可达 1/30)、变异谱扩大、能打破旧的性状连锁、实现基因重组且变异性状稳定、短时间内可育出新品种等特点而成为作物品种改良的重要途径之一<sup>[21]</sup>。在经辐射诱变后的作物育种过程中, 常规遗传学方法不仅成本高、耗时长和易受环境条件影响, 而且具有盲目性和不确定性。TILLING 技术的引入可以弥补以上两方面的不足。首先, TILLING 技术筛选是直接由基因水平进行筛选, 因此可以有效地排除因生理损伤引发的  $M_1$  代植株的表型变异; 其次, 选取的靶基因是研究者感兴趣的重要农艺性状基因, 筛选过程中是按靶基因序列设计特异性引物, 因此使得选择结果具有可预测性。

在众多的辐射诱变源中, 重离子束具有能量和质量沉积效应, 同时还具有传能线密度(linear energy transfer, 简称 LET)大、相对生物效应(relative biological effectiveness, 简称 RBE)高和损伤后修复效应小等其他常规辐射源所没有的优势, 在植物诱变育种研究中具有突变率高、突变谱广和突变体稳定周期短( $M_1$ )等特点<sup>[22]</sup>。近年来, 重离子束辐射诱变育种工作在国内外蓬勃发展, 取得了丰富的成果。2009 年, Niwa 等<sup>[23]</sup>首次利用  $^{12}C^{6+}$  离子束辐照野生型条斑紫菜, 成功筛选到色素变异细胞。中国科学院近代物理研究所与甘肃省张掖市农业科学研究所合作, 利用兰州重离子研究装置(HIRFL)提供的重离子束选育出矮秆、抗逆、高产、优质的春小麦 M-920 和丰产、高蛋白含量、抗黑穗病的陇辐 2 号, 并取得了巨大经济效益<sup>[24]</sup>。TILLING 技术实质上是一种高通量点突变筛选方法和快速精确鉴定技术, 该技术借助高通量的检测手段, 能够快速有效地从诱变过的突变群体中鉴定

出突变体。如果将 TILLING 技术与辐射诱变技术, 尤其是与重离子束诱变结合起来, 不但可发挥重离子束辐射诱变频率高和优异变异多等优点, 还可以融合 TILLING 技术的高效筛选性和结果可预见性等优点, 能有效剔除非遗传变异, 显著提高选择效率, 从而加快植物辐射诱变育种的进程, 为今后开展植物重离子诱变高通量筛选工作奠定基础。

#### 参考文献(References):

- [1] Uauy C, Paraiso F, Colasuonno P, *et al.* BMC Plant Biology, 2009, **9**: 115.
- [2] Wang Dekai, Sun Zongxiu, Tao Yuezhi. Acta Genetica Sinica, 2006, **33**(11): 957.  
(汪得凯, 孙宗修, 陶跃之. 遗传学报, 2006, **33**(11): 957.)
- [3] Comai L, Henikoff S. The Plant Journal, 2006, **45**(4): 684.
- [4] Colbert T, Till B J, Tompa R, Reynolds S, *et al.* Plant Physiology, 2001, **126**(2): 480.
- [5] Ren Weibo, Guo Huiqin, Xu Zhu, *et al.* Journal of Anhui Agriculture, 2009, **37**(21): 9827(in Chinese),  
(任卫波, 郭慧琴, 徐柱, 等. 安徽农业科学, 2009, **37**(21): 9827.)
- [6] McCallum C M, Comai L, Greene E A, *et al.* Nature Biotechnology, 2000, **18**: 455.
- [7] Wu Haibin, Zhu Rucai, Zhao Degang. Molecular Plant Breeding, 2004, **2**(4): 574(in Chinese).  
(吴海滨, 朱汝财, 赵德刚. 分子植物育种, 2004, **2**(4): 574.)
- [8] Huse S M, Huber J A, Morrison H G, *et al.* Genome Biology, 2007, **8**(7): 143.
- [9] Chawade A, Sikora P, Br utigam M, *et al.* BMC Plant Biology, 2010, **10**(1): 86.
- [10] Gady A L F, Hermans F W K, Van de Wal M H B J, *et al.* Plant Methods, 2009, **5**: 13.
- [11] Ishikawa T, Kamei Y, Otozai S, *et al.* BMC Molecular Biology, 2010, **11**: 70.
- [12] Ashton E J. Methods Molecular Biology, 2011, **688**: 1.
- [13] Li Dan, Wang Jiaqi, Bu Dengpan, *et al.* Biotechnology Bulletin, 2009, **7**: 48(in Chinese).  
(李旦, 王加启, 卜登攀, 等. 生物技术通报, 2009, **7**: 48.)
- [14] Parry M A J, Madgwick P J, Bayon C, *et al.* Journal of Experimental Botany, 2009, **60**(10): 2817.
- [15] Hofinger B J, Jing H C, Hammond K E, *et al.* TAG Theoretical and Applied Genetics, 2009, **119**(5): 851.
- [16] Greene E A, Codomo C A, Taylor N E, *et al.* Genetics, 2003, **164**: 731.
- [17] Bush S, Krysan P. Plant Physiology, 2010, **154**: 25.
- [18] Krysan P. Plant Physiology, 2004, **135**(3): 1162.

- [19] Sato Y, Shirasawa K, Takahashi Y K, *et al.* *Breeding Science*, 2006, **56**(2): 179. (周利斌, 李文建, 曲颖, 等. 原子核物理评论, 2008, **25**(2): 165.)
- [20] Morita R, Kusaba M, Iida S, *et al.* *Genes and Genetic Systems*, 2009, **84**(5): 361. [23] Niwa K, Hayashi Y, Abe T, *et al.* *Phycological Research*, 2009, **57**(3): 194.
- [21] Wang Shaoping. *Seed*, 2008, **27**(12): 63(in Chinese). (王少平. 种子, 2008, **27**(12): 63.) [24] Qu Ying, Li Wenjian, Zhou Libin, *et al.* *Nuclear Physics Review*, 2007, **24**(4): 294(in Chinese). (曲颖, 李文建, 周利斌, 等. 原子核物理评论, 2007, **24**(4): 294.)
- [22] Zhou Libin, Li Wenjian, Qu Ying, *et al.* *Nuclear Physics Review*, 2008, **25**(2): 165.

## The Latest Progress of TILLING Technique and Its Prospects in Irradiation Mutation Breeding<sup>\*</sup>

DU Yan<sup>1,2</sup>, YU Li-xia<sup>1,2</sup>, LIU Qing-fang<sup>1,2</sup>, ZHOU Li-bin<sup>1, #</sup>, LI Wen-jian<sup>1, #</sup>

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*;

2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

**Abstract:** TILLING(Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) is a novel, high-throughput and low-cost reverse genetics technique. In recent years, with innovation of the mutation screening techniques, TILLING platform has become more diversified, which makes the operation of TILLING technique more simple and rapid. For this reason, it is widely used in crop breeding research. In this paper, we summarized the latest progress of TILLING technique, meanwhile, we also discussed the prospect of combining irradiation mutation with the high-throughput TILLING technique in mutation breeding.

**Key words:** Targeting Induced Local Lesions IN Genomes; high-resolution melting curve; irradiation; mutation breeding

\* **Received date:** 6 Jan. 2011; **Revised date:** 15 Feb. 2011

\* **Foundation item:** Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences(KJJCX2-YW-N34-3, KJJCX2-EW-N05); Director Fund of Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences(Y006090ZY0)

# **Corresponding author:** Li Wen-jian, E-mail: wjli@impcas.ac.cn; Zhou Li-bin, E-mail: libinzhou@impcas.ac.cn